

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 ⁴ C07K 15/06, 15/04, 3/20 A61K 39/00, 39/395, C12N 5/00 C12N 15/00, C12P 21/00 G01N 33/53, 33/577	A1	(11) 国際公開番号 WO 89/ 01947 (43) 国際公開日 1989年3月9日 (09.03.89)
(21) 国際出願番号 POT/JP88/00833 (22) 国際出願日 1988年8月22日 (22. 08. 88) (31) 優先権主張番号 特願昭62-207403 特願昭63- 205690 (32) 優先日 1987年8月22日 (22. 08. 87) 1988年8月20日 (20. 08. 88) (33) 優先権主張国 JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 三井東圧化学株式会社 (MITSUI TOATSU CHEMICALS, INCORPORATED) (JP/JP) 〒100 東京都千代田区霞が関三丁目2番5号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 村松 喬 (MURAMATSU, Takashi) (JP/JP) 村松寿子 (MURAMATSU, Hisako) (JP/JP) 〒891-01 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘三丁目2番9号 Kagoshima, (JP) 井上 浩 (INOUE, Hiroshi) (JP/JP) 〒890 鹿児島県鹿児島市日之出町22-22 Kagoshima, (JP) 栗屋 昭 (AWAYA, Akira) (JP/JP) 〒244 神奈川県横浜市中区戸塚区矢部町1541番地 Kanagawa, (JP) 福井英雄 (FUKUI, Hideo) (JP/JP) 〒297 千葉県茂原市東部台三丁目9番9号 Chiba, (JP)	橋本幸秀 (HASHIMOTO, Yoshihide) (JP/JP) 〒297 千葉県茂原市東部2141番地 Chiba, (JP) (74) 代理人 弁理士 若林 忠 (WAKABAYASHI, Tadashi) 〒107 東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル8階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title: PROTEIN DERIVED FROM LIVING BODY (54) 発明の名称 生体由来のタンパク質 (57) Abstract A protein specifically found in living bodies between fertilization and one week after birth, such as an embryonic brain of a mouse, and having a molecular weight of about 68,000 and an isoelectric point of 5.4 to 5.6 has been isolated by affinity chromatography using lectin as affinity ligand. A polyclonal antibody and a monoclonal antibody for the protein have also been prepared. The monoclonal antibody has been yielded by a hybridoma which can yield the monoclonal antibody. Further, separation of the protein from an extract of a living body using these antibodies have also been conducted. In the staining tests of cancer tissues of various cancer patients using these antibodies according to the vector staining methods A, B, C etc., these antibodies have been found to be useful as effective ingredients for cancer-diagnosing agents.		

(57) 要約

マウス胎児脳等の受精から生後1週間までの生体に特異的に見い出され、分子量約68,000、等電点5.4～5.6であるタンパク質がレクチンを親和薬として用いたアフィニティークロマトグラフィーによって単離された。また、該タンパク質に対するポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体が調製された。該モノクローナル抗体は、該モノクローナル抗体生産能を有するハイブリドーマにより生産された。更に、これら抗体を用いて生体抽出液からの該タンパク質の分離が行なわれ、またこれら抗体を用いた各種癌患者の癌組織のベクタステインABC法等による染色試験において、これら抗体の癌診断薬の有効成分としての有用性が確認された。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパムフレット第1頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FR	フランス	MR	モーリタニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	MW	マラウイ
BB	バルバドス	GB	イギリス	NL	オランダ
BE	ベルギー	HU	ハンガリー	NO	ノルウェー
BG	ブルガリア	IT	イタリア	RO	ルーマニア
BJ	ベナン	JP	日本	SD	スーダン
BR	ブラジル	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CF	中央アフリカ共和国	KR	大韓民国	SN	セネガル
CG	コンゴ	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソビエト連邦
CH	スイス	LK	スリランカ	TD	チャード
CM	カメルーン	LU	ルクセンブルグ	TG	トーゴ
DE	西ドイツ	MC	モナコ	US	米国
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		
FI	フィンランド	ML	マリ		

- 1 -

明 細 書

生体由来のタンパク質

技 術 分 野

本発明は、脳・神経系の細胞増殖、分化あるいは他の臓器・組織の成長・発育等に必須であり、その促進ないし調節に重要な役割を果たし、脳・神経系の異常に基く疾患、各臓器・組織の成長・発育の不全あるいは異常増殖および癌等の治療剤および予防剤、あるいはこれらの診断用剤などへ適用し得るマウス胎児脳等より単離された分子量約68,000、等電点5.4～5.6であるタンパク質（以後G P 68タンパク質と略称する）に関する。また、本発明は該G P 68タンパク質の分離精製方法、該G P 68タンパク質に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体生産能を有するハイブリドーマならびにこれら抗体の製造方法に関する。

更に、該G P 68タンパク質またはこれら抗体を含有する上記各種疾患の治療剤、予防剤、あるいは診断用剤として有用な医薬組成物に関する。

背 景 技 術

脳・神経系の組織・細胞中に存在するタンパク質等

- 2 -

に関する研究は、他の臓器や器官に存在するタンパク質等の研究に比して遅れているものの、近年多くの知見が集積されつつある。

例えば、脳・神経系の組織・細胞中に存在するタン
5 パク質等として、チューブリン、微小管結合タンパク質 (microtubule-associated proteins, MAPs)、ニューロフィラメントトリプレット、グリア繊維酸性タンパク質 (glial fibrillary acidic protein, GFA
タンパク質) [日本生化学会編、続生化学実験講座
10 6、細胞骨格の構造と機能、上、第1章、第2章および、下、第9章参照] などが知られている。

脳・神経系の細胞中に含まれる各種物質、特に脳・
神経系の細胞の分化において機能するタンパク質などの
検索と、その機能の分析は、例えば各種脳・神経系
15 疾患の新しい治療薬および予防薬、あるいはそれらの
診断方法の開発に有用なタンパク質等を見い出す上で、
極めて有効な手段である。

それ故、脳・神経系の細胞中に含まれる各種物質の
検索およびその機能の分析に対する要請が高まってい
20 る。

このような観点から種々の検討がなされているなか
で、脳・神経系の細胞由来のタンパク質として、マ
ウス胎児脳に時期特異的に出現するタンパク質の存在
が本発明者らによって既に明らかにされている

- 3 -

[特開昭60-100597号公報、Noguchi, S., et al ; J. Biochem. , 96, 881 (1984)] 。

また、ヒト脳・神経系腫瘍細胞に特異的に出現するタンパク質の存在が特開昭61-233623号公報に本発明者らによって開示されている。

一方、マウス、ラットの脳・神経系細胞腫などに検出されるが、正常マウス脳および正常ラット脳には検出されないか、もしくはわずかししか検出されないタンパク質の存在が本発明者らによって開示されている [特開昭 61-275221号公報、および Noguchi, S., et al ; Cell Structure and Function, 12, 127 (1987)] 。

発 明 の 開 示

本発明者らは、上述のように脳・神経系の組織・細胞に含まれるタンパク質の重要性に鑑み種々のタンパク質等の物質の検索を行なってきたが、その過程で、マウス胚（胎児）の脳に存在するタンパク質のなかで、最もその存在比率が高く、脳・神経系の異常に基づく疾患、各臓器・組織の成長・発育の不全あるいは異常増殖および癌等の治療剤、予防剤などへの適用が大いに期待される二次元電気泳動法で分子量約68,000を示し、等電点が5.4 ～5.6 であるタンパク質（G P 68 タンパク質）に着目した。

- 4 -

ところが、該 G P 68タンパク質の存在量は極めて微量であり、また従来の方法では夾雑する各種タンパク質の混入が避けられない場合が多く、高い精製度で量的に十分な G P 68タンパク質を得ることが必要となっていた。

そこで、本発明者らは、より効率良い G P 68タンパク質の分離精製方法について鋭意検討した結果、レクチンを担体に結合したアフィニティークロマトグラフィーを行なう工程を G P 68タンパク質の単離精製工程に新たに導入することにより、夾雑タンパク質の混入を効果的に排除し、より純度の高い形で、十分な量の G P 68タンパク質を効率良く単離精製できることを見出した。更に、この新たな知見に基いた精製方法によって十分な量の G P 68タンパク質が得られるようになり、その結果 G P 68タンパク質に対する抗体の生産に成功し、またそれを用いた確実な G P 68タンパク質の分離精製方法を確立するに至り、本発明を完成した。

本発明の目的は、G P 68タンパク質の性質および機能を分析し、その医薬、動物薬、あるいは診断薬としての有用性を明確とするのに必要な技術である、量的に十分なより精製度の高い G P 68タンパク質を分離精製できる方法を提供することにある。

本発明の他の目的は、例えば、脳・神経系の疾患の

みならず各臓器・組織の成長・発育の不全あるいは異常増殖および癌等を有する患者のマーカーとしての G P 68タンパク質を、該タンパク質に対するポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体で検出する
5 各種免疫測定法の開発に必要な技術、およびこれら抗体自身ならびにその製造方法、あるいは治療剤及び予防剤としての該抗体を含有する医薬組成物を提供することにある。

本発明の他の目的は、脳神経系はじめ各臓器の成長
10 ・発育の不全を予防あるいは治療するための G P 68タンパク質を含有する医薬組成物を提供することにある。

上記目的を達成する本発明は、マウス胎児脳等より単離された分子量約 68,000、等電点 5.4 ~ 5.6 である
15 G P 68タンパク質、該 G P 68タンパク質の分離精製方法、該 G P 68タンパク質に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体生産能を有するハイブリドーマならびにこれら抗体の製造方法及び該 G P 68タンパク質またはこれら抗体を含有する上記各種疾患の治療剤、予防剤、あるいは診断
20 用剤として有用な医薬組成物を包含する。

発明を実施するための最良の形態

本発明の G P 68タンパク質の第 1 の分離精製方法

- 6 -

は、G P 68タンパク質の単離段階に、レクチンを親和試薬として担体に結合（固定化）して用いたアフィニティークロマトグラフィーによる工程が導入されていることに特徴を有する。

5 すなわち、G P 68タンパク質および例えば種々の夾雑タンパク質を含む混合物を、レクチンを担持（固定化）した担体に接触させて該担体にG P 68タンパク質を吸着させ、更に該担体からG P 68タンパク質を選択的に単離する。

10 この工程に用いることのできる担体としては、例えばアガロース、アクリルアミドゲル、各種トヨパール（東洋曹達工業社製）、セルロースなどを挙げる事ができる。

15 また、担体に固定化させるレクチンとしては、ヒマ凝集素（*Ricinus Communis Agglutinin*、以下R C Aと略記する）、小麦胚アグルチニン（*Wheat Germ Agglutinin*, W G A）、コンカナバリンAなどを用いることができるが、これらの中では、R C Aが特に好適である。

20 レクチンを担体に担持（固定化）させる方法としては、用いる担体およびレクチンの種類に応じて常法に従って行なえば良い。

これらを用いてのアフィニティークロマトグラフィーは、レクチンを担持した担体を適当な大きさ及

- 7 -

び形状のカラムに通して利用するカラム法や、レクチンを担持した担体と処理すべき溶液あるいは溶出用溶液とを一度に混合して処理するバッチ方式を用いた方法など所望に応じて適宜選択した方法によって実施す

5 れば良い。

このようなレクチンを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、マウス胎児脳などの各種組織・細胞の抽出液のみならず、各種精製段階で得られる G P 68タンパク質を含む溶液を処理して、 G P 68タン
10 パク質を分離精製することが可能である。

マウス組織・細胞から G P 68タンパク質を分離する場合には、例えば、2%トリトン (Triton) X - 100 (ローム アンド ハース 社製)、0.005%フェニルメチルスルフォニルフルオライド (P M S F)、0.15
15 M 食塩を含む10mMトリス・塩酸緩衝液 (pH7.5) 中にマウス組織・細胞をホモジナイズして所定時間の抽出操作を行ない、得られた粗抽出液から遠心分離 (例えば、40,000rpm) で得られる上清液を用いることができる。

20 なお、この時用いるマウス組織・細胞としては、受精から生後1週間までの、例えば、受精後11日目胚～19日目胚の胎児や、生後1週間のマウスの脳、神経組織、胃腸管、平滑筋組織、肝臓、心臓、腎臓、肺、脾臓等の各臓器などを挙げることができるが、高濃度で

の抽出分離を行いたい場合には胎児脳あるいは生後 1 週間位までのマウス脳を用いるのが便利である。

レクチンを担持する担体に吸着させた G P 68タンパク質は、溶出用の溶液として G P 68タンパク質を選択的に溶出できる組成の溶液を選択して用いることにより、G P 68タンパク質を溶出させて、これと他のタンパク質とを分離することができる。

この溶出用の溶液は、レクチンおよび担体の種類などに応じて適宜選択すれば良いが、例えば、0.01M ~ 0.2Mのラクトース溶液、N-アセチルグルコサミン溶液、 α -メチルマンノシド溶液、シアル酸溶液などを利用することができる。

溶出画分中での G P 68タンパク質の確認は、その分子量および等電点の測定などによって行なうことができる。

本発明の G P 68タンパク質は、後述の実施例 1 に記載の 2 次元電気泳動での測定で約 68,000 (68,000 \pm 2,000) の分子量を有し、その等電点が 5.4 ~ 5.6 である。

以上のような操作によって分画した G P 68タンパク質を含む画分を、更に例えばゲルろ過法などの必要に応じたその他の各種精製方法に用いられている各種工程で処理して、より高純度の G P 68タンパク質を効率良く得ることが可能である。

このゲルろ過法には、通常のタンパク質精製技術で用いられている方法が適用できる。

このようにして得られた純度の高いG P 68タンパク質は、後述の実施例 1 に示されるアミノ酸組成及び糖組成を有し、そのアミノ末端部分のオリゴペプチドのアミノ酸配列は、マウスの α -フェトプロテインのアミノ末端のアミノ酸配列 [Michael B. Gorin et al., J. Biol. Chem., 256, 1954 (1981)] とほぼ同一であった。また、糖の含有率は12.7重量%であった。

10 該G P 68タンパク質は、脳・神経系はじめ各臓器の成長・発育の不全を予防あるいは治療するための医薬として有用な医薬組成物の有効成分として有用である。

次に、上記G P 68タンパク質を用いて動物を免疫し、該G P 68タンパク質に対する抗体を調製することができる。

すなわち、G P 68タンパク質を例えばラット、ウサギ、ヤギ、ウマ、ウシなどの動物に免疫し、得られた抗血清中にG P 68タンパク質に対するポリクローナル抗体を得ることができる。

この免疫処理には、通常の方法が利用でき、例えば各種動物の背中、足蹠、腹腔内、血管内などに適当なアジュバントとともにG P 68タンパク質を接種する。免疫後、7～200 日経過した動物から抗血清を採取し

- 10 -

て目的とするポリクローナル抗体を得ることができる。

なお、初回免疫後、適当な間隔をおいて追加免疫して抗体価を高めることができる。

5 一方、上記のようにして免疫した動物や、Balb/cなどのようなマウスの脾細胞と骨髓腫細胞（ミエローマ細胞）株との融合によって、G P 68タンパク質に対するモノクローナル抗体生産能を有するハイブリドーマを作製することができる。

10 この融合に用いるミエローマ細胞株としては、マウスNS-1株、X 63-Ag8株、MPC-11 株、SP-2/0株などのマウス系のミエローマ細胞株やラット210.RCY、Ag1.2.3などを挙げることができる。

15 また、G P 68タンパク質で免疫した動物としては、初回免疫後10～80日経過したものが好適である。

20 更に、融合は公知の方法で行なえば良く、得られたハイブリドーマは、例えば 5～20% の牛胎児血清とHATを含むRPMI培養液（日水製薬社製、Code 05911）、続いてHTを含むRPMI培養液、最終的にRPMI培養液などの細胞培養用培地で培養して、培地中に所望とするG P 68タンパク質に対するモノクローナル抗体を分泌、備蓄させて該モノクローナル抗体を生産することができる。

あるいは、該ハイブリドーマをヌードラット、また

は免疫抑制されたラットの腹腔内に移植してその腹水癌化を誘発し、該腹水中に該モノクローナル抗体を生産、備蓄させる方法によって該モノクローナル抗体を生産することができる。

- 5 こうして得られたポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は、先に述べたように、各種免疫測定法によって脳・神経系の疾患のみならず各臓器・組織の成長・発育の不全あるいは異常増殖および癌等を有する患者の疾患マーカーとしての G P 68タンパク質を検出する際の試薬の成分として、またこれらの抗体を含む治療剤および予防剤の開発に有用である。一例として、G P 68タンパク質に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を用いて各種癌患者の癌組織を蛍光抗体法により染色してみると、癌組織のみにお
- 10 いて特異的に本発明のこれら抗体によって組織・細胞が染色されることが明らかとなり、癌の診断薬として抗 G P 68タンパク質抗体が有用であることが明かとされた。

- 15 また、G P 68タンパク質に対する抗 G P 68タンパク質ポリクローナルウサギ（ラット）抗血清及び抗マウス α -フェトプロテインポリクローナルウサギ抗血清とのオクタルロニー（Ouchterlony）法によるゲル内沈降反応を行なったところ、両抗血清は G P 68タンパク質に対して同様の沈降反応を示し、マウス G P 68タン
- 20

- 12 -

パク質とマウス α -フェトプロテインとはここでもかなり近似したタンパク質であることが解った。

他方、同時に行なったオクタロニー法によるゲル内沈降反応で、G P 68タンパク質に対するウサギ抗血清とは異なり、ヒト胎盤 α -フェトプロテインに対するウサギ抗血清（ヘキスト社製）はG P 68タンパク質と沈降反応を示さなかった。これに対応する事実として、ヒト癌患者組織抗原をベクタステインA B C法あるいは蛍光抗体法により染色してみると、両血清の反応性には明瞭な差異があることが示された（表1 A及び表1 B）。そして、抗G P 68タンパク質抗血清は、抗ヒト α -フェトプロテイン抗血清よりもスペクトラムが広く、かつ強度が高いことが明らかとなった。

また、こうして得た抗体を用いて作製したアフィニティークロマト担体を用いて本発明における第2のアフィニティークロマトグラフィーを行なうことにより、G P 68タンパク質の分離精製を行なうことができる。

その際用いる担体としては、アガロース、セファデックス類、BrCN活性化セファロース4Bのようなセファロース類、Afigel 10 (Bio-Rad 社製)、各種トヨパールなどを利用することができ、担体への結合方法は、適当な緩衝液などに抗体を溶解し、4℃で数時間から一昼夜担体とまぜあわせて行なえば良い。

この G P 68タンパク質に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行なう場合、吸着した G P 68タンパク質を溶出させる溶液としては、酸性緩衝液、アルカリ性緩衝液あるいは高濃度の塩を含む中性緩衝液などが利用できる。

本発明の G P 68タンパク質または抗 G P 68タンパク質抗体を有効成分とする医薬組成物は、必要に応じた各種添加剤と混合することによって調製することができる。該添加剤としては、例えばアルブミン、ゼラチン、デキストラン、Tween 80などのポリソルベート系等の非イオン界面活性剤、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、脂肪酸アルコールエステル、ポリグリコールエーテル、リン酸緩衝生理食塩水、各種アミノ酸、デキストロース、マンニトール、グルコース、キシリトール、乳糖、ショ糖、ガラクトース、フラクトース、マルトース、サッカロース、ソルビトールなどの糖類等を挙げることができ、これらの 1 種または 2 以上を組み合わせて用いることができる。

本発明の医薬組成物は、たとえば錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒、トローチ、カシエー、エリキシル、乳濁液、溶液、シロップ、懸濁液、エアロゾル、軟膏、無菌注射器、成型パップ、テープ、軟質及び硬質ゼラチンカプセル、坐薬及び無菌包装粉末などの形態として利用できる。

- 14 -

更に、本発明の医薬用組成物は、製薬的に許容される担体等の添加剤として、上記の例示物の他に、充填剤、結合剤、滑沢剤、湿潤剤、崩壊剤、乳濁および懸濁剤、保存剤、希釈剤、甘味剤あるいは芳香剤等として作用する各種物質を含有し得る。

これらの添加剤の例としては、とうもろこし澱粉、結晶セルロース、アラビアゴム、リン酸カルシウム、アルジネート、ケイ酸カルシウム、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン、トラガカントゴム、ゼラチン、シロップ、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、メチルヒドロキシ安息香酸エステル、プロピルヒドロキシ安息香酸エステル、タルク、ステアリン酸マグネシウム、不活性なポリマー類、水及び鉱油等が挙げられる。

なお、本発明の医薬組成物は、投薬の後の活性成分の放出速度が所望に応じて制御されるように処方しても良い。

本発明の医薬用組成物を経口投与する場合には、例えば G P 68タンパク質または抗 G P 68タンパク質抗体は、上記担体等と混合され、錠剤、カプセル剤などの形とすることができる。

静脈内点滴もしくは注射、あるいは筋肉内注射等の非経口投与の場合、例えば G P 68タンパク質または抗 G P 68タンパク質抗体の有効量を、ブドウ糖水溶液、

等張食塩水、無菌水あるいは類似の液体に溶解し、バイアルまたはアンプルに密封することができる。

なお、バイアルまたはアンプル剤とした場合には、その安定性を向上させるために、G P 68タンパク質または抗 G P 68タンパク質抗体の凍結乾燥品をバイアル
5 やアンプル内で調製しても良い。

本発明の医薬組成物中での G P 68タンパク質または抗 G P 68タンパク質抗体の含有量は、必要に応じて適宜選択すれば良いが、例えば単位投薬量形状あたり、
10 0.1 μ g ~ 50mg程度とすることができる。

以下、実施例、実験例をもって本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

15 100 個の ICR マウス胎児脳（受精後 13 日胚脳）を、100ml の 2% トリトン X - 100 、 0.005% PMSF、0.15 M 食塩を含む 10mM トリス・塩酸緩衝液（pH 7.6）中でホモジェナイズして、4℃、30 分の抽出を行ない、得られた粗抽出液を 120,000 \times g 、1 時間の条件の高速
20 遠心にかけた後、更に得られた上清液を以下のようにして調製した R C A アガロース アフィニティークロマトグラフィーカラム（4ml）に通した後、上記緩衝液 40 ml でこのカラムを洗浄した。

カラムへの充填；

- 16 -

R C A アガロース (EY Laboratories 社製) の 4mℓ を円筒状カラムに充填し、これを 1 % トリトン X-100、0.005% PMSF を含む 10mM トリス・塩酸緩衝液 (pH7.5) で処理し平衡化した。

- 5 次に該カラムに 1 % トリトン X-100、0.005% PMSF を含む 10mM トリス・塩酸緩衝液 (pH7.5) に更に 0.1 M ラクトースを加えた 20 mℓ の溶液を通し、溶出液を得た。

- 10 この溶出液の一部を充分透析して精製タンパク質溶液を得た後、これを凍結乾燥してタンパク質標品を得た。

なお、タンパク質標品の収量は、100 個のマウス胚の脳あたり 2.0mg タンパク質であった。

- 15 また、タンパク質量は、ローリー (Lowry) 法により、牛血清アルブミン (シグマ社製) を標準として求めた。なお、以下の各種操作でのタンパク質量の測定も同様の方法により行なった。

- 20 一方、これとは別に、先の溶出液の残りにエタノールを最終濃度が 80~90% となるように加えてエタノール沈殿タンパク質を得て、これをタンパク質標品とした。

得られたタンパク質標品の一部を以下の条件の二次元電気泳動にかけて、その分子量および等電点を測定したところ、この標品から分子量約 68,000、等電点

5.4 ~ 5.6 のタンパク質のみが検出された。

なお、分子量測定での対照のタンパク質としては、
いずれもシグマ社製のチログロブリン（分子量
330,000）、ラクトフェリン（分子量88,000）、ウシ血
5 清アルブミン（分子量67,000）、卵白アルブミン（分
子量43,000）、アルドラーゼ（分子量34,000）を使用
した。

二次元電気泳動の条件；

a) 一次元目

10 泳動用媒体として、尿素2.76g、30% アクリルアミ
ド 0.67 ml、10% NP-40の1 ml、アンホライン
(pH3.5 -10) の0.25 ml、10% 過硫酸アンモニア
10 μ l、5%テトラメチルエチレンジアミン [tetra-
methylethylenediamine (TEMED)、半井化学社製]
15 0.14 ml、水0.91 mlの組成のものを使用し、サン
プルをこの一次元ゲルにかけ、陽極液として10mM
H₃PO₄、陰極液として20mM NaOHをそれぞれ用い、
400Vで13時間、次で800Vで1時間電気泳動を行なっ
た。

20 b) 二次元目

一次元泳動後、ゲルをソジウムドデシルサルフェー
ト (SDS) 試料緩衝液 [10% グリセリン、5 %
 β -メルカプトエタノール、23% SDS、62.5mMトリス
・塩酸緩衝液 (pH6.8)] と平衡化し、7.5%のアクリ

- 18 -

ルアミドスラブゲル (25mM トリス、192mM グリシン、0.1% SDS) にかき、120Vで4時間の二次元目の泳動を行なった。

泳動後、0.05% クマシブルー、10% メチルアルコール、10% 酢酸で1時間ゲルを染色した後、更に10% メチルアルコール、10% 酢酸で処理し、得られた各スポットを測定した。

次に、先に得た G P 68タンパク質の凍結乾燥標品 (1 mgタンパク質) における糖含有率を、バアティら (Bhatti et al) の方法に従って、メタノリシス反応を行なった後にガス液体クロマトグラフィーにより求めた。

一方、該凍結乾燥標品中のシアル酸の含有率を、0.05 M H_2SO_4 を用いた80℃、30分の加水分解反応を行なった後に、N-acetylneuraminic acid を標準として用いたThiobarbituric acid 反応により求めた。

更に、該 G P 68タンパク質の凍結乾燥標品 (タンパク質量としてそれぞれ1 mgあるいは98 μ g)を4M HClでの100℃、4時間の処理あるいは6M HClでの105℃、24時間の処理によって加水分解し、得られた加水分解物中のヘキソサアミンあるいはアミノ酸を、日立アミノ酸分析器835型により分析した。

以上の分析操作の結果を以下に示す。

糖組成 (モル比) ;

- 19 -

	ガラクトース	1
	マンノース	1.42
	フルクトース	0.32
	グルコース	0.07
5	グルコサミン	1.06
	ガラクトサミン	0.10
	シアル酸	0.18
アミノ酸組成（モル比）；		
10	アスパラギン酸	43.2
	スレオニン	26.1
	セリン	35.8
	グルタミン酸	58.4
	グリシン	30.2
15	アラニン	30.6
	システイン	6.9
	バリン	23.3
	メチオニン	5.2
	イソロイシン	9.5
20	ロイシン	48.4
	チロシン	8.6
	フェニルアラニン	17.4
	リジン	26.3
	アンモニア	90.1

- 20 -

ヒスチジン	10.6
アルギニン	18.2
プロリン	26.5

5

更に、上記 G P 68タンパク質の凍結乾燥標品 (105 μ g) を 25 μ ℓ の水に溶解させ、その 17 μ ℓ (71.4 μ g) をペプチドシーケンサー (Applied Science 社 Model 477A) に適用して、そのアミノ末端のアミノ酸配列を分析したところ、以下の結果が得られた。

10

G P 68タンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列；

Leu-His-Glu-Asn-Glu-Phe-Gly-Ile-Ala-Ser-Thr-
Leu-Asp-Ser-X -Gln-Y -Lys-Thr-Glu-Lys-
(X、Y は未確定)

15

なお、参考のためにマウス α -フェトプロテインのアミノ末端のアミノ酸配列 [Michael B. Gorin et al., J. Biol. Chem., 256, 1954 ~ (1981)] は以下のとおりである。

マウス α -フェトプロテインのアミノ末端のアミノ

20

酸配列；

Leu-His-Glu-Asn-Glu-Phe-Gly-Ile-Ala-Ser-Thr-
Leu-Asp-Ser-Ser-Gln-Cys-Val-Thr-Glu-Lys-

更に、G P 68タンパク質 (上記凍結乾燥標品) に対する抗マウス G P 68タンパク質ポリクローナルウサギ

抗血清（実施例 2 で調製）及び抗マウス α -フェトブ
ロテインポリクローナルウサギ抗血清（ヘキスト社
製）のオクタルロニー (Ouchterlony) 法によるゲル内
沈降反応を行なったところ、両抗血清は G P 68タンバ
ク質に対して同様の沈降反応を示した。

実施例 2

実施例 1 で得た G P 68タンバク質の凍結乾燥標品と
エタノール沈殿標品の 1 : 1 での混合物 100 μ g を、
2 週間おきにフロイントの完全アジュバント（半井化
学社製）とともに計 4 回ウサギ（ニュージーランドホ
10 ワイト種）の足蹠に接種してこれを免疫した。

最終免疫後 10 日目に全採血し、血清を調製した。得
られた血清は、BSA を結合した Afigel 10（Bio Rad
Laboratories 社製）カラムに通し、流出液を更に、
15 1mg/ ml 濃度の G P 68タンバク質を含む重炭酸ナトリ
ウム緩衝液 (pH 8.0) と接触させた Afigel 10 を充填し
たカラムに通し、抗体を吸着させた。次に、3M のチ
オシアン酸カリウム溶液で吸着抗体を溶出させ、流出
液を集めた。この操作を必要な回数繰り返し抗体溶液
20 を備蓄した。

この抗体を含む流出液を充分透析し、20 μ g/ ml の
タンバク濃度とし、イムノブロッティング法により分
析したところ、G P 68タンバク質に対するポリクロー
ナル抗体が含まれていることが確認された。

実施例 3

実施例 1 で得た G P 68タンパク質の凍結乾燥標品と
エタノール沈殿標品の 1 : 1 での混合物 500 μ g を、
2 週間おきにフロイントの完全アジュバントとともに
5 計 4 回ヤギの各所皮内、皮下に投与して、これを免疫
し、経時的に採血した。

十分抗体価が上った 5 箇月後に全採血した。得られ
た血清を実施例 2 と同様にカラム処理して、G P 68タ
ンパク質に対するポリクローナル抗体を集積し、その
10 一部を分析したところ、G P 68タンパク質に対する特
異的抗体であることが確認された。

実施例 4

免疫する動物としてウマを用いる以外は実施例 3 と
同様にしてポリクローナル抗体を集積した。

15 実施例 5

免疫する動物としてウシを用いる以外は実施例 3 と
同様にしてポリクローナル抗体を集積した。

実施例 6

実施例 1 で得た G P 68タンパク質の凍結乾燥標品と
20 エタノール沈殿標品の 1 : 1 での混合物を以下に示す
量で、2 週間間隔でウイスターラット (5 ~ 6 週令)
に投与し、これを免疫した。

1 回目 (皮下) 50 μ g

2 回目 (皮下) 50 μ g

- 23 -

3 回目 (腹腔内) 100 μ g

4 回目 (腹腔内) 100 μ g

5 最終免疫から 3 日目の脾細胞の 1×10^8 個と、ミエローマ細胞としてのマウス NS-1 細胞株の 2×10^7 個とをポリエチレングリコール 400 の存在下で Koehler の方法に従って融合させた。

10 ポリエチレングリコールを除き、得られたハイブリドーマを 200ml の HAT 培地 (HAT 及び 10% fetal calf serum (FCS) を含む RPMI 1640 medium) に浮遊させ、これを 96 ウエルプレート (Falcon 社製) に各ウエル当りの細胞数が 1×10^5 個となるように移した。

次に 37°C で 1 週間～10 日培養を続けた。

15 培養 10 日目より 3 日ごとに各ウエル培養上清の半分を用いて (その分新しい培養液を加えて培養を続ける)、ベクタスティン ABC 法 (Vectastain ABC method、アビジン-ビオチン化ワサビペルオキシダーゼコンプレックス法、フナコシ社販売) による ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) を行ない、陽性クロー
20 ンを含むウエルを検索し、更に陽性のものを含むウエルから限界希釈法によるクローニングを行なって所望とするクローンを得た。

なお、ELISA 法に用いたアッセイプレート 2095 (Falcon 社製) には、常法に従い実施例 1 で得たエタ

ノール沈殿 G P 68タンパク質を溶解したリン酸緩衝生理食塩水（以下 PBS）と 1 ～ 数時間接触させることによって、各ウェルに G P 68タンパク質を 100ng 吸着させて使用した。

5 以上の操作で、計 8 個の陽性クローンが得られた。

これらのクローンのうちの 2 種（EBR 3、EBR 7）をそれぞれ個々に用いて以下のようにして EBR 3-1 モノクローナル抗体、EBR 7-1 モノクローナル抗体を得た。

10 なお、これらクローン EBR 3 及び EBR 7 は、昭和 63 年（1988 年） 8 月 18 日付けで、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号、郵便番号 305）にブタペスト条約に基づいて寄託された。

これらクローンの原寄託日は、昭和 63 年（1988 年） 8 月 18 日であり、クローン EBR 3 の受託番号は FERM BP-2002、クローン EBR 7 の受託番号は FERM BP-2003 である。

20 実施例 7

実施例 6 で得たハイブリドーマ（クローン EBR 3、EBR 7）を用いた G P 68タンパク質に対するモノクローナル抗体の生産を実施した。

まず、クローン EBR 3、EBR 7 を別々に RPMI 1640

培地で、10cmシャーレ中で培養した。

得られた2種の培養上清から50% 硫酸で沈殿した沈
殿物を1～2 mlのPBSに溶解し、3日間PBSで透析
した。次いで、透析処理後の溶液をセファデックスG
5 -250 カラムに通し、精製EBR 3-1 モノクローナル抗
体および精製EBR 7-1 モノクローナル抗体を得た。

更に、プリスタン処理[2,6,10,14-テトラメチルペ
ンタデカン0.5ml/匹を腹腔内に投与し、1～2週飼
育する]した8週令ヌードラットに実施例6で得られ
10 たクローンEBR 3、EBR 7を個々に 1×10^7 /匹とな
るように腹腔内に投与した。10～21日目に腹水のた
まったラットから腹水(50 ml/匹)を採取し、これ
から遠心分離により固形分を除去した。

得られた上清を50% 硫酸塩析、40% 硫酸塩析し、更
15 にPBS (pH7.2) で3日間透析した。

得られた粗精製モノクローナル抗体は、セファデッ
クスG-200 カラムにかけて、PBSで溶出させ、精製
モノクローナル抗体(EBR 3-2 モノクローナル抗体お
よびEBR 7-2 モノクローナル抗体)をそれぞれ個々に
20 含む2種の溶液を回収した。

実施例 8

ハイブリドーマの形成に、ウイスターラットの代り
にBalb/cマウスを用いる以外は、実施例6及び実施例
7と同様の操作を繰り返して、精製モノクローナル抗

体（EBR 3-3 モノクローナル抗体およびEBR 7-3 モノクローナル抗体）を得ることができた。

実施例 9

5 常法に従って、Afigel 10 と実施例 2 で得られたポリクローナル抗体の緩衝液溶液とを 4℃で 1 昼夜接触させる方法を用いて、ポリクローナル抗体を固定化したカラムを作製した。

このカラムで、実施例 1 で得たマウス胎児脳抽出液を処理したところ、GP 68タンパク質を効率良く単離、精製することができた。

実施例 10

15 実施例 7 で得た精製モノクローナル抗体（EBR 3-1 モノクローナル抗体およびEBR 7-1 モノクローナル抗体）をそれぞれ用いる以外は実施例 9 と同様にしてマウス胎児脳抽出液を処理したところ、GP 68タンパク質を効率良く単離、精製することができた。

実施例 11

20 実施例 1 で得た精製タンパク質溶液（RCAアガロースカラムからの溶出液を透析処理して得たもの）を、1 バイアル中 GP 68タンパク質の 100 μ g が含まれるように充填し、凍結乾燥させた後、これにTween 80を 0.001 ~ 0.1 % となるように加えた生理食塩水溶液 1.0ml を加えて栓をして、GP 68タンパク質を有する医薬組成物を得た。

実施例 12

Tween 80の代りに、アルブミンを0.001 ~ 10%となるように加えた生理食塩水溶液を用いる以外は実施例 11と同様にして G P 68タンパク質を有する医薬組成物を得た。

実施例 13

Tween 80の代りに、マンニトールを0.01~5 %となるように加えた生理食塩水溶液を用いる以外は実施例 11と同様にして G P 68タンパク質を有する医薬組成物を得た。

実施例 14

Tween 80の代りに、グルコースを0.01~5 %となるように加えた生理食塩水溶液を用いる以外は実施例 11と同様にして G P 68タンパク質を有する医薬組成物を得た。

実施例 15a ~ 15d

1 バイアル中 G P 68タンパク質の量を1mg となるように凍結乾燥を行なう以外は、実施例 11~14と同様にして G P 68タンパク質を有する医薬組成物をそれぞれ得た。

実施例 16

実施例 7 で得た 2 種の精製モノクローナル抗体を含む溶液をそれぞれ個々に用い、1 バイアル中抗 G P 68タンパク質モノクローナル抗体の100 μ g が含まれる

ように充填し、凍結乾燥させた後、これにTween 80を0.001 ~ 0.1 %となるように加えた生理食塩水溶液1.0mlを加えて栓をして、抗GP68タンパク質モノクローナル抗体を有する医薬組成物を得た。

5 実施例 17

Tween 80の代りに、アルブミンを0.001 ~ 10%となるように加えた生理食塩水溶液を用いる以外は実施例16と同様にして抗GP68タンパク質モノクローナル抗体を有する医薬組成物を得た。

10 実施例 18

Tween 80の代りに、マンニトールを0.01~5 %となるように加えた生理食塩水溶液を用いる以外は実施例16と同様にして抗GP68タンパク質モノクローナル抗体を有する医薬組成物を得た。

15 実施例 19

Tween 80の代りに、グルコースを0.01~5 %となるように加えた生理食塩水溶液を用いる以外は実施例16と同様にして抗GP68タンパク質モノクローナル抗体を有する医薬組成物を得た。

20 実験例 1

実施例2で得たポリクローナル抗体を用いたマウス胚および生後1~30日のマウスの各臓器のトリトン X-100による抽出物のウェスタンブロット法による分析を以下のようにして実施した。

まず、マウス（13日胚）およびマウスの各臓器（脳、神経節、心臓、肺、肝臓、胃腸管、脾臓等）を用い以下のようにして処理し抽出物を得た。

試料を2%トリトン X-100、50 μ g /m ℓ のPMSFを含む0.01 Mトリス・塩酸緩衝液中でホモジェナイズし、氷上で30分間抽出を行なった。得られた抽出液を40,000rpm、一時間の遠心分離処理し、得られた上清液をエタノール沈殿処理した。ここで得られた沈殿に含まれるタンパク質量をローリー法により定量しておいた。

次に、レムリ（Laemmli）の方法（Nature , 227 , 680 ~ 685 , 1970 ）に従って、SDS可溶化溶液 [9.5 M 尿素 2% NP-40 (半井社製) 、 2%アンホライン（ファルマシア社製） 、 5%メルカプトエタノール、 0.25% SDS] に沈殿物が4 mg/m ℓ （最終濃度）となるように溶解し、これをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃度10%、10~15 μ ℓ / レーン、すなわち40~60 μ g タンパク質 / レーン ）にかけた。

泳動が終了した後、トウビンらの方法 [Towbin et al, Proc. Nat. Acad. Sci., 76, 4350 ~ 4354, 1979] に従って、上記の分画された各タンパク質の位置を保ちながら、これらをニトロセルーロース膜（Schleicher & Schuell社製またはBio-Rad 社製）にブロッティングした（1アンペアで2時間）。

- 30 -

ブロッキング終了後、ニトロセルーロス膜を3%ウシ血清アルブミン (BSA)を含むPBS と室温で1時間接触させた。

その後、ニトロセルーロス膜を1%トリトン X-100 を含むPBS で洗浄後、これを実施例2で得た抗GP68タンパク質に対する抗体 (100 ~ 500 倍に希釈したラットあるいはウサギ血清) で2 ~ 3時間室温で処理した。

更に、1%トリトン X-100を含むPBS での1時間の洗浄を数回行なった後、HRP (horse radish peroxidase、Cappel社製) 結合抗ラットIgG あるいは抗ウサギIgG マウスIgG 抗体 (100 倍希釈) を含む溶液で1時間処理した。

次に、1%トリトン X-100を含むPBS での1時間の洗浄を5 ~ 6回行なった後、0.05% の4-chloro-1-naphtol の40mMトリス・塩酸溶液 (pH7.6)で膜を処理し、灰褐色に染色されたバンドの出現を目視で観察した。

その結果マウス胚の各組織の抽出物では、どの抽出物からも染色されたスポットが検出された。

例えば、13、15及び17日胚の頭部、腹部及び尾部の抽出物のいずれにおいても染色されたスポットが検出された。

一方、生後1 ~ 7日のマウスの各組織・細胞からの

抽出物においても染色されたスポットが検出された。

例えば、誕生直後のマウスの頭部、腹部及び尾部の抽出物のいずれにおいても染色されたスポットが検出され、更に生後7日目のマウスの脳、肝臓、腎臓、肺、心臓、皮膚、脾臓、筋肉からの抽出物のいずれにおいても染色されたスポットが検出された。このうち、肝臓、心臓の染色の程度は強く、脳はびまん性の弱い染色を示した。

10 これに対して、生後1週間を越えたマウスの各組織・細胞からの抽出物では染色されたスポットは全く検出されなかった。

例えば、生後14日、21日のマウスの脳、肝臓、腎臓、肺、心臓、皮膚、脾臓、筋肉からの抽出物、及びマウス成体の脳、肝臓、腎臓、肺、心臓、皮膚、脾臓、筋肉、子宮、脊髄からの抽出物のいずれにおいても染色されたスポットは検出されなかった。

15 従って、GP68タンパク質は、増殖あるいは分化の極めて盛んな胎児および生後間もない時期に特異的に出現する生物活性を有するタンパク質であると考えられる。

実験例2

20 マウス15日胚をドライアイスアセトン中で急冷して、クリオスタットで切片を切り出し、これらに実施

例 7 で得た EBR 3-1 モノクローナル抗体および EBR 7-1 モノクローナル抗体を含む溶液のそれぞれの10倍希釈液を個々に加え、更にこれらに HRP 結合抗ラット IgG マウス IgG 抗体を 1 ~ 2 週間反応させ、洗浄後染色する臓器を光学顕微鏡で観察した。また、実施例 6 に示した ABC を用いて更に観察した。

その結果、EBR 3-1 モノクローナル抗体では神経および平滑筋が染り、また EBR 7-1 モノクローナル抗体では脳、神経節、肝臓が染ったことが観察された。

10 実験例 3

経日的にマウス胚の脳細胞を取り出し、組織培養を行なった。これに実施例 7 で得られた EBR 3-1 モノクローナル抗体および EBR 7-1 モノクローナル抗体を加え、脳細胞の活動を観察した。

15 実験例 4

実施例 2 で得た抗マウス G P 68 タンパク質ウサギ抗血清及び抗ヒト α -フェトプロテインウサギ抗血清をそれぞれ用いて、前記 A B C 法により各種癌患者の癌組織の染色を行なった。

20 得られた結果を表 1 A 及び表 1 B に示す。なお、評価結果における、「-」は染色せず、「+-」は弱いかつびまん性の染色、「+」は中程度の染色、「++」は顕著だが「+++」よりは弱い染色、「+++」は顕著な染色を示す。

- 33 -

一方、同様に行なったマウス線維芽細胞、健常人の各細胞、及び癌患者の癌組織以外の正常組織細胞では何ら染色されず、抗マウス G P 68タンパク質ウサギ抗血清は、癌組織抗原特異的に反応する抗体を有することが示された。

また、表 1 A 及び表 1 B に示されるように、抗 G P 68タンパク質ウサギ抗血清は、抗ヒト α -フェトプロテインウサギ抗血清が染色しない癌患者組織を染色し、かつ染色強度も後者に比べて、弱いものではなく、同等かそれ以上の強度を示すことが歴然であり、癌診断薬の成分としての有用性の高いものであることがわかった。

表 1 A

症例番号	診断癌種	器官	抗GP68タンパク質ウサギ抗血清	抗ヒト α -フェトプロテインウサギ抗血清
1	ヒト13週胚		+++	+++
2	星状細胞腫	脳	-	-
3	〃	〃	+-	+-
4	〃	〃	-	-
5	〃	〃	-	-
6	〃	〃	+-	+-
7	頭蓋咽頭腫	〃	+-	+-
8	多形性 神経膠芽腫	〃	-	-
9	神経膠腫	〃	+-	+-
10	未熟型奇形腫	〃	+-	-
11	髓芽細胞腫	〃	+-	+-
12	〃	〃	+-	+-
13	髄膜腫	〃	-	-
14	〃	〃	-	-
15	〃	〃	+-	+-
16	〃	〃	+-	+-
17	〃	〃	+-	+-
18	原始外胚葉腫	〃	-	-
19	殆ど正常肝臓	肝臓	+-	+-
20	胆管腫	〃	++	+-
21	〃	〃	+++	+-
22	肝癌	〃	-	-
23	〃	〃	++	+
24	〃	〃	+	+-
25	〃	〃	+	+
26	〃	〃	+-	+-
27	〃	〃	+	+-
28	〃	〃	+	+-
29	〃	〃	+	+
30	〃	〃	-	-
31	〃	〃	++	+
32	肝硬変	〃	+	+-
33	〃	〃	+-	+-
34	〃	〃	+	-
35	〃	〃	+-	-

表1B

症例番号	診断癌種	器官	抗GP68タン パク質ウサギ 抗血清	抗ヒト α -フェ トプロテインウ サギ抗血清
36	腺癌	肺	++	-
37	肺腺癌	〃	+	-
38	〃	〃	++	-
39	〃	〃	+-	-
40	〃	〃	+-	-
41	卵黄嚢腫	卵巢	++	+
42	〃	〃	++	++
43	腺癌	胃	++	-
44	〃	〃	++	++
45	〃	〃	+	+
46	分化型腺癌	〃	++	+-
47	胎生癌	睾丸	+	-
48	〃	〃	+	-
49	〃	〃	++	+
50	〃	〃	++	+
51	〃	〃	++	+-
52	〃	〃	++	+
53	精上皮腫	〃	+	-
54	〃	〃	+	-
55	〃	〃	++	-
56	〃	〃	+	+-
57	〃	〃	+-	+-
58	〃	〃	++	+
59	〃	〃	++	-
60	〃	〃	+	+
61	〃	〃	++	-
62	〃	〃	+	-
63	〃	〃	+	-
64	〃	〃	++	+-
65	〃	〃	++	-
66	〃	〃	+	-
67	〃	〃	+	-
68	〃	〃	+	-
69	変形分化腺 癌	子宮	++	-

産業上の利用可能性

本発明により、脳・神経系の発生分化の過程で時期特異的に消長し、その発生分化の過程で、重要な役割を果す可能性のある G P 68タンパク質が単離された状態
5 態で提供された。

また、本発明の精製分離方法により十分な量の純度の高い G P 68タンパク質を得ることが可能となった。

更に、本発明の G P 68タンパク質に対する抗体を用
10 いることにより、該抗体を用いた各種研究の促進が容易となる。

本発明の G P 68タンパク質は、受精から生後 1 週間までの特定の時期にしか存在せず、成体においてはその生産が欠失していることから、該タンパク質を成体
15 に投与して新たな機能の発現が期待できる。

また、本発明の G P 68タンパク質は生体各器官、組織、細胞、膜の発育促進、遺伝的、器質的な各臓器・組織の成長・発育の不全の解消・回復、脳・神経系の再生・修復などの効果が期待できる。

20 本発明により G P 68タンパク質に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が得られたことによって、G P 68タンパク質をコードする m-RNA および c-DNA の調製が容易となり、遺伝子組み換え技術を用いた例えば大腸菌、枯草菌、酵母、各種動物細胞を宿

- 37 -

主とした G P 68タンパク質の生産への道がひらかれた。

G P 68タンパク質あるいはその活性中心ペプチド
およびそれらに特異的な抗体は、各種脳・神経系疾患
の治療剤、予防剤、また各種成長・発育促進剤、各種
成長不全治療剤あるいは異常増殖、腫瘍、癌などの医
薬、動物薬、または脳・神経系疾患、各臓器・組織の
成長・発育不全あるいは異常増殖および癌などの疾患
のマーカー、更には診断薬としての有用性が期待され
る。

寄託微生物への言及

1. クローン EBR 3

寄託機関；

名 称：通商産業省工業技術院微生物工業技術研
究所

住 所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号
(郵便番号 305)

寄託日；昭和63年(1988年) 8月18日

受託番号；F E R M B P - 2 0 0 2

(ブタベスト条約に基づいた寄託)

2. クローン EBR 7

寄託機関；

名 称：通商産業省工業技術院微生物工業技術研
究所

住 所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号
(郵便番号 305)

寄託日；昭和63年（1988年） 8月18日

受託番号；FERM BP-2003

(ブタペスト条約に基づいた寄託)

請 求 の 範 囲

- 1) 受精から生後1週間までの生体に特異的に見い出され、分子量約68,000、等電点5.4～5.6であることを特徴とするタンパク質。
- 5 2) 前記生体がマウスである請求項1記載のタンパク質。
- 3) 受精から生後1週間までのマウス組織あるいは細胞の抽出液から、レクチンを親和試薬として用いたアフィニティークロマトグラフィーにより単離されたものである請求項1記載のタンパク質。
- 10 4) 受精から生後1週間までの生体の組織あるいは細胞の抽出液をレクチンを担持した担体と接触させる過程と、該担体に吸着した成分から分子量約68,000、等電点5.4～5.6であるタンパク質を選択的に溶出し単離する過程とを含むことを特徴とするタンパク質の製造方法。
- 15 5) 前記抽出液が、受精から生後1週間までのマウス組織または細胞の抽出液である請求項4記載の製造方法。
- 20 6) 受精から生後1週間までの生体に特異的に見い出され、分子量約68,000、等電点5.4～5.6であることを特徴とするタンパク質を動物に免疫する過程を経て得られることを特徴とする該タンパク質に対するポリクローナル抗体。

- 7) 前記生体がマウスである請求項6記載のポリクローナル抗体。
- 8) 受精から生後1週間までの生体に特異的に見い出され、分子量約68,000、等電点5.4～5.6であるタンパク質で免疫した動物の脾細胞と骨髓腫細胞株との融合により得られ、該タンパク質に特異的であるモノクローナル抗体生産能を有することを特徴とするハイブリドーマ。
- 9) 前記生体がマウスである請求項8記載のハイブリドーマ。
- 10) 受精から生後1週間までの生体に特異的に見い出され、分子量約68,000、等電点5.4～5.6であるタンパク質に特異的であることを特徴とするモノクローナル抗体。
- 11) 受精から生後1週間までの生体に特異的に見い出され、分子量約68,000、等電点5.4～5.6であるタンパク質で免疫した動物の脾細胞と骨髓腫細胞株との融合により得られたハイブリドーマにより生産されたものである請求項10記載のモノクローナル抗体。
- 12) 前記生体がマウスである請求項11記載のモノクローナル抗体。
- 13) 受精から生後1週間までの生体に特異的に見い出され、分子量約68,000、等電点5.4～5.6である

タンパク質で免疫した動物の脾細胞と骨髓腫細胞株とを融合させることによりハイブリドーマを得る過程 (A) と、得られたハイブリドーマから前記タンパク質に対するモノクローナル抗体の生産能を有するハイブリドーマを選択し、該選択されたハイブリドーマに前記モノクローナル抗体を生産させる過程 (B) とを有することを特徴とする前記タンパク質に対するモノクローナル抗体の製造方法。

1 4) 前記過程 (B) が、前記モノクローナル抗体生産能を有するハイブリドーマを組織培養液中で培養し、該培養液内に前記モノクローナル抗体を生産、備蓄させる過程からなり、その後、該培養液から前記モノクローナル抗体を分離する請求項 1 3 記載のモノクローナル抗体の製造方法。

1 5) 前記過程 (B) が、前記モノクローナル抗体生産能を有するハイブリドーマを、ヌードラットまたは免疫抑制されたラットの腹腔内に移植してその腹水癌化を誘発し、該腹水中に該モノクローナル抗体を生産、備蓄させる過程からなり、その後、該腹水から前記モノクローナル抗体を分離する請求項 1 3 記載のモノクローナル抗体の製造方法。

1 6) 前記生体がマウスである請求項 1 3 ～ 1 5 のいずれかに記載のモノクローナル抗体の製造方法。

1 7) 請求項 1 記載のタンパク質に対する抗体を担

持した担体に、請求項 1 記載のタンパク質を含む混合物を接触させる過程と、該担体に吸着した成分から該タンパク質を選択的に溶出し、単離する過程とを含むことを特徴とするタンパク質の分離方法。

- 5 18) 前記抗体が請求項 6 記載のポリクローナル抗体である請求項 17 に記載の分離方法。
- 19) 前記抗体が請求項 10 記載のモノクローナル抗体である請求項 17 に記載の分離方法。
- 20) 請求項 1 記載のタンパク質を含有することを
10 特徴とする医薬組成物。
- 21) 請求項 6 記載の抗体を含有することを特徴とする医薬組成物。
- 22) 請求項 10 記載の抗体を含有することを特徴とする医薬組成物。